様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基礎研究(B)
研究期間：2006～2008
課題番号：18310133
研究課題名（和文） 大腸菌の全ての機能未知転写因子の支配下遺伝子群の同定と制御様式の解明
研究課題名（英文） Identification of Regulation Targets and Analysis of Regulation Modes by Uncharacterized Transcription Factors from Escherichia coli

研究代表者
石浜 明（ISHIHAMA AKIRA）
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号：80019869

研究成果の概要：転写酵素 RNA ポリメラーゼの転写対象遺伝子群の選択は、転写因子との相互作用によって決定される。約 300 種類の大腸菌転写因子のうち、約 100 種は制御機能未知である。本研究では、機能未知転写因子が認識する配列から制御機能を同定する Genomic SELEX 法を開発した。純化転写因子を利用した解析から、各転写因子の制御対象遺伝子群の同定に成功したことで、ゲノム転写包括制御の全貌解明の展望が開けた。

交付額

<table>
<thead>
<tr>
<th>(金額単位：円)</th>
<th>直接経費</th>
<th>間接経費</th>
<th>合 計</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>2006年度</td>
<td>5,500,000</td>
<td>1,650,000</td>
<td>7,150,000</td>
</tr>
<tr>
<td>2007年度</td>
<td>4,800,000</td>
<td>1,440,000</td>
<td>6,240,000</td>
</tr>
<tr>
<td>2008年度</td>
<td>5,000,000</td>
<td>1,500,000</td>
<td>6,500,000</td>
</tr>
<tr>
<td>年度</td>
<td>年度</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>総 計</td>
<td>15,300,000</td>
<td>4,590,000</td>
<td>19,890,000</td>
</tr>
</tbody>
</table>

研究分野：複合新領域

科研究の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学
キーワード：ゲノム調節、転写、遺伝子、細菌、発現制御

1. 研究開始当初の背景
ゲノム全構造が解明された後の、21 世紀の生命科学の攻抜目標は、ゲノムに存在する全遺伝子の生理機能を同定し、また発現し利用される遺伝子が選択される機構を解明することであった。こうしたゲノムの全体像を知る研究には、個別遺伝子の情報が多く、ゲノム遺伝子総数の大腸菌は、格好の研究対象であった。そうした時代背景で、モデル生物・大腸菌ゲノムの約 4,400 の遺伝子が、生存環境に適応して、ゲノムから転写をする遺伝子群を選択する機構の解明を目指した研究でボストゲノムシークエンス時代の生命科学の先駆を見た決意をした。

2. 研究の目的
大腸菌ゲノムの 4,400 遺伝子から転写される遺伝子の選択機構について、研究代表者・石浜は、転写酵素 RNA ポリメラーゼが、転写因子との会合で、選択対象遺伝子を選択することを決定されるとの理論を提唱していた。理論を検証する目的では、大腸菌に予想されている約 300 種の転写因子のそれぞれが支配し制御する遺伝子群を同定し、その制御様式を網羅的に解析することが求められる。モデル生物として最も理解されてきた大腸菌でも、研究開始時には、約 100 種類の転写因子については、機能未知であった。従って、大腸菌全転写因子の制御機能解析によるゲノム転写制御の全体像理解を目指し、本研究では、機能未知転写因子全 100 種の支配下遺伝子群の同定と制御機構の解明を目指し、そのための実験方法と資源開発を含めた研究構想を提案した。
3. 研究の方法

本研究では、機能未知転写因子の支配下遺伝子群の同定を転写制御様式の解明を目指して、以下の研究構想を提案した。

（1）機能未知転写因子300種の遺伝子の発現クラウンを構築し、蛋白を純化精製する。
（2）転写因子を用い、前に我々が開発したGenomic SELEX法で、各転写因子が認識するDNA塩基配列を決定する。
（3）転写因子結合部位に隣接する遺伝子群の転写転写因子による制御を、in vitro及びin vivo両面で解析し、検証する。
（4）転写因子の細胞内濃度を定量的Western法で計測し、またその活性制御に影響する要因・要素を、Phenotype Microarrayシステムで探索する。
（5）これらを統合して、機能未知転写因子100種のゲノム転写制御への関わりに関するモデルを提唱する。

4. 研究成果

上記の研究計画で、3年間にわたって研究を実施し、以下の成果を得た。

（1）大腸菌転写因子300種のうち、290種の発現系を同定し、280種に関しては精製純化した。
（2）転写因子と、大腸菌ゲノムDNA断片混合物を利用して、転写因子が認識するDNA塩基配列を決定するGenomic SELEX法と、DNA microarrayを利用してゲノム上の配列由来を同定するSELEX-chip法を開発した。
（3）転写因子結合配列から、制御支配下遺伝子群を予測する方法を確立した。
（4）機能未知転写因子100種をほぼ全て純化し、Genomic SELEXとSELEX-chip解析を実施し、少なくとも半数においては、転写因子の結合を示す特異性を示すことが遺伝子群を特異的として結合することを実証した。
（5）転写因子の選択性は、特定DNAの認識を示さなかった転写因子については、特異性を付与する要素・要因を、Phenotype Microarrayで解析した。

（6）解析転写因子欠損大腸菌変異系を利用し、生体内での、試験転写因子による予測支配下遺伝子群の制御については、Northern blot法などで、mRNAを直接計測することで実証した。

（7）多数の転写因子の支配下遺伝子群を同定出来たことで、多くの新しい概念を発見した。例えば、①10種類以上のプロモーター群を支配する新種（包括転写因子）の発見、②10種類以上もの転写因子の制御を受ける「多因子支持プロモーター」の発見、③ひとつの転写因子支配下別の転写因子遺伝子が含まれる「転写因子ネットワーク」の発見など、原核細胞の転写制御の新しい局面を明らかにすることが出来た。

（8）機能未知転写因子の解析に加えて、生理機能の一端が若くされている転写因子の一部についても解析を行なったところ、既知の以外にも、多数の遺伝子を制御していることが判明した。従って、今後は、制御機能既知転写因子約200種についても、解析を広げることとした。

本研究を発展させて、ひとつの生物の全ての転写因子の調節標的遺伝子群の同定と、制御機構の全観の解明を目指す新たな攻め目標が生まれた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者）には下線）

【雑誌論文】（計46件）


② Hasegawa, A., Ogasawara, H., Kori, A. and Ishihama, A.: AllR is the


⑦ Ogasawara, H., Hasegawa, A., Kanda, E., Miki, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Genomic SELEX search for regulation targets by 100 species of uncharacterized transcription factors from E. coli. 12th Transcription Assembly, March 2-5, 2009. Chandigarh, India


[学会発表] (計 72 件)

① Ishihama, A.: Genomic SELEX search for regulation targets by 100 species of uncharacterized transcription factors from E. coli. 12th Transcription Assembly, March 2-5, 2009. Chandigarh, India


India

(8) Ishihama, A.: Systematic search for regulatory roles of putative transcription factors with unidentified functions. The 10th Transcription Assembly, Dec. 2006. Kolkata, India


[その他]
ホームページ等
http://www.k.hosei.ac.jp/ceng/fb/teacher/ishihama.html

6. 研究組織
(1) 研究代表者
石浜 明 (ISHIHAMA AKIRA)

(2) 法政大学・生命科学部・教授
研究者番号: 80019869

[図書] (計 6 件)

(1) Ishihama, A.: The nucleoid: an overview. In: Escherichia coli and Salmonella